

# Accelerin : the activated form(s) of human blood coagulation factor V

Citation for published version (APA):

Bakker, H. M. (1994). *Accelerin : the activated form(s) of human blood coagulation factor V*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19940617hb>

## Document status and date:

Published: 01/01/1994

## DOI:

[10.26481/dis.19940617hb](https://doi.org/10.26481/dis.19940617hb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# SUMMARY and CONCLUDING REMARKS

The purpose of the work described in this thesis was to gain more insight in some of the mechanisms of which thrombin formation is controlled during haemostasis, in particular with respect to the plasma proteins factor V (Va), activated protein C and protein S. The first chapter gives an overview of the blood coagulation mechanism and to the literature pertinent to the current hypothesis concerning the mode of action of these proteins in the regulation of prothrombin activation. Purification of factor V from human plasma is described in Chapter 2. Factor V circulates in plasma in a concentration of approximately 8  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim 25$  nM). Due to the lability of factor V complete inhibition of proteases during the isolation procedure is essential. The factor V purification method is in part based on the procedure developed by Dahlbäck (1980) and Suzuki *et al.* (1982). Modifications we made to this procedure resulted in decrease of the isolation time, higher yield, higher concentration of factor V and less contamination in the final preparation. Gel filtration (AcA-34 in the original procedures) is now performed with a Superdex-200 column coupled to a Pharmacia FPLC system. We also included a final ion-exchange chromatography step using a MonoS column with the FPLC system to remove final remaining contaminations. This considerably improved our factor V isolation in terms of speed, quantity, and quality compared to the preparations chromatographed on low pressure gel filtration materials. Using this procedure, factor V was purified from plasma more than 4000-fold with a yield of 20% in 55 hours.

Protein C, when activated, is an important regulator of factor Va (see Chapter 4) and VIIIa activity. Activation of protein C by non-physiological activators is of special interest since such activators can be used as tools in studies on the structure-function relationship of protein C, in the preparation of APC from protein C, and in the development of functional protein C assays. Current quantitative protein C assay methods use a protein C activator isolated from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*. This reaction is strongly inhibited by calcium ions and (at least in the case of human protein C) by NaCl. This phenomenon is of special importance for the use of this activator in a quantitative protein C assay, which, because of this sensitivity, requires well-controlled ionic strength and free  $\text{CaCl}_2$  concentration.

Chapter 3 describes the purification and characterization of a protein C activator from the venom of *Agkistrodon halys halys*. The protein C activator from *Agkistrodon halys halys* venom was purified 533-fold by ion-exchange chromatography on QAE-Sephadex A-50, affinity chromatography on aprotinin-Sepharose and MonoQ fast protein liquid chromatography (FPLC). The purified enzyme is a single chain protein with an apparent molecular weight of 36,000. Activation of human protein C results from a specific cleavage in the heavy chain of the molecule. In the case of protein C activation by its physiological activator, thrombin, this cleavage has been identified to result in the removal of a dodecapeptide of 1,400Da from the amino-terminus of the heavy chain (Kisiel, 1979). The protein C activator purified from *Agkistrodon halys halys* very likely activates human protein C via the same pathway. The protein C activator exhibits a high amidolytic activity towards the chromogenic substrates S2302 and S2238. The activity of the activator is not affected by thiolprotease or metalloprotease inhibitors. Considerable inhibition, however, is observed when the protein C activator is incubated with the serine protease inhibitors benzamidin and soybean trypsin inhibitor, and virtually complete inhibition with the active site titrant pNPGb and inhibitor PPACK. This indicates that the protein C activator from *Agkistrodon halys halys* contains an active site serine and histidine which classifies the enzyme as a serine protease. The purified protease can activate both human and bovine protein C. Activation of human protein C only occurs at an appreciable rate in a calcium-free reaction medium at low ionic strength.  $\text{Ca}^{2+}$  ions inhibited the activation of human protein C with an apparent  $K_i$  of 0.8 mM. Sodium chloride also strongly inhibits human protein C activation (with a  $K_{i \text{ app}}$  of 20 mM NaCl). In contrast, activation of bovine protein C is hardly affected by variation of  $\text{Ca}^{2+}$  and NaCl concentrations in the reaction medium. The apparent  $K_i$ 's for calcium ion and NaCl inhibition of bovine protein C activation are >10 mM and 220 mM, respectively. Kinetic analysis of human protein C activation by the venom activator (in a calcium-free medium and at low ionic strength,  $I = 0.05$ ) revealed an apparent  $K_m$  for protein C of 0.52  $\mu\text{M}$  and a  $k_{\text{cat}}$  of 0.17  $\text{s}^{-1}$ . The catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) observed is  $3.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . At higher ionic strength ( $I = 0.15$ ) rates of human protein C activation become linear with protein C, indicating a strong increase in  $K_m$  with increasing ionic strength. Bovine protein C is activated (in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions and at  $I = 0.1$ ) with a  $K_m$  of 0.056  $\mu\text{M}$  and a  $k_{\text{cat}}$  of 0.24  $\text{s}^{-1}$ . The catalytic efficiency of bovine protein C activation ( $k_{\text{cat}}/K_m = 4.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) is 13-fold higher than of human protein C activation ( $3.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). This is caused by a lower  $K_m$  of the venom activator for

bovine protein C. These data are indicative for a rather large conformational and/or structural difference between human and bovine protein C at physiological ionic strength. In addition it seems likely that, in contrast to bovine protein C, the conformation of human protein C changes considerable with changing ionic strength. Protein C activation by thrombin is also inhibited by calcium-ions but when thrombomodulin is present this reaction requires the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

Factor Va cofactor activity *in vivo* is down regulated by activated protein C in concert with protein S. In Chapter 4, we have analyzed the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, phospholipids and protein S on the kinetic parameters of APC-catalyzed factor Va inactivation using purified human proteins. In agreement with earlier reports, we observed that factor Va inactivation by APC is not strictly dependent on the presence of phospholipids and protein S. The reaction in free solution requires the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, and at the optimal  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration (2 mM), the reaction proceeds with a second order rate constant of  $6.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . The inactivation reaction in free solution has a high  $K_m$  for factor Va ( $>78 \text{ nM}$ ). APC-catalyzed factor Va inactivation is greatly accelerated by negatively charged phospholipid vesicles. The extent to which phospholipids stimulate the reaction is dependent on the phospholipid concentration and composition. Optimal rates of factor Va inactivation are obtained in the presence of  $10 \text{ }\mu\text{M}$  phospholipid vesicles with high mole percentage anionic phospholipid (DOPS/DOPC; 20/80; M/M). Under these reaction conditions APC-catalyzed factor Va inactivation was characterized by an apparent second order rate constant of  $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . This is 230-fold higher than the rate constant in free solution. The stimulatory effect of phospholipids on APC-catalyzed factor Va inactivation exhibits a clear optimum both with respect to the phospholipid concentration and DOPS/DOPC composition. Membranes that are solely composed of the neutral phospholipid phosphatidylcholine are not able to accelerate APC-catalyzed factor Va inactivation. Thus, in order to stimulate factor Va inactivation, membranes have to contain anionic phospholipids. The ability to stimulate factor Va inactivation is not strictly confined to phosphatidylserine-containing membranes since membranes with other anionic phospholipids considerably enhance factor Va inactivation as well. The ability of different anionic phospholipids to enhance factor Va inactivation increased in the order phosphatidylethanolamine < oleic acid < phosphatidic acid < phosphatidylglycerol < phosphatidylmethanol < phosphatidylserine. Acceleration of APC-catalyzed factor

Va inactivation by negatively charged membranes is presumably a reflection of the fact that both APC and factor Va bind to such membranes. This allows the inactivation of membrane-bound factor Va by membrane-bound APC. The apparent  $K_m$  for factor Va is greatly decreased in the presence of phospholipid membranes and appears to be a function of the phospholipid concentration present in the reaction medium. When the concentration of phospholipid is increased there is a parallel increase of the  $K_m$ . Also the  $V_{max}$  of APC-catalyzed inactivation of factor Va appears to be a function of the phospholipid concentration. The  $V_{max}$  increases with the amount of phospholipid present and reaches a plateau at 10  $\mu$ M phospholipid. This strongly suggests that, in the presence of phospholipid, surface-bound factor Va is inactivated by surface-bound APC. In addition, the experiments presented in Chapter 4 indicate clearly that the promotion by protein S of APC binding to membranes is of minor importance in purified human system. In a model in which protein S promotes the binding of APC to phosphatidylserine containing membranes, one would expect that protein S exerts its stimulatory effect preferentially at low phospholipid concentrations and on membranes with low amounts of phosphatidylserine, *i.e.* at conditions under which the rate of factor Va inactivation would be limited by the binding of APC to the membrane. The lack of such preferential stimulation may be regarded to support the alternative hypothesis that protein S abrogates the ability of factor Xa to protect factor Va from inactivation by APC, or that other proteins (*e.g.* a plasma protein S-binding protein) are required for full expression of protein S anticoagulant activity (Walker, 1986). Furthermore it is possible that protein S exhibits other anticoagulant properties, such as the recently described APC independent interaction of protein S with factor Va (Heeb *et al.*, 1993). It is clear that the precise mechanisms of action of protein S as an antithrombotic or anticoagulant remains to be established.

Snake venom proteases have been shown to be excellent tools in studying the structure-function relationship of coagulation factors. A proteolytic enzyme capable of inactivating factor Va was previously isolated from venom of the Elapid snake *Naja naja oxiana* (NO) (Gerads *et al.*, 1992). The *Naja naja oxiana* enzyme alters factor Va into a molecule with greatly diminished cofactor activity (factor Va<sub>(NO)</sub>). Incubation of factor Va with the venom protease results in a time-dependent loss of factor Va activity with a stable residual activity of some 10-15% after 40 minutes of incubation. In Chapter 5, we describe the structural changes in factor Va following incubation with the *Naja naja oxiana* enzyme. The resulting change in cofactor activity of factor Va<sub>(NO)</sub> was subsequently analyzed. SDS-PAGE revealed that the

molecular weight of the heavy chain changed from 105 kD to approximately 100 kD after incubation with the venom protease. The light chain is not affected by incubation of factor Va with the *NO* protease. Direct binding studies on planar phospholipid bilayers in an ellipsometer show that factor Va and factor  $Va_{(NO)}$  bound with comparable affinity to a phospholipid membrane ( $K_d$ 's of 4.2 and 2.8 nM respectively). From this experiment we conclude that the decreased cofactor activity of factor  $Va_{(NO)}$  in prothrombin activation is not due to reduced binding affinity of  $Va_{(NO)}$  for phospholipid membranes. N-terminal amino acid sequence analysis showed that the factor  $Va_{(NO)}$  preparation contains, in addition to the known termini of the heavy and light chains of factor Va, a new amino-terminus with the amino acid sequence Asp-Arg-Leu-Glu-Pro-Glu. Matching the newly formed N-terminus in factor  $Va_{(NO)}$  with the known complete amino acid sequence of factor V indicates that the venom enzyme cleaves the heavy chain between His<sup>682</sup>-Asp<sup>683</sup>, removing 27 amino acids from the carboxyterminal part of the heavy chain. The cofactor activities of factor Va and factor  $Va_{(NO)}$  were compared by measuring their ability to support factor Xa-catalyzed prothrombin activation in the presence of phospholipids and calcium ions. Both factor Va and  $Va_{(NO)}$  molecules stimulate the binding of factor Xa to negatively charged phospholipids. However, the amounts of factor Va and  $Va_{(NO)}$  required for half maximal prothrombinase complex formation differ considerably (0.7 nM factor Va *versus* 9.42 nM factor  $Va_{(NO)}$ ). Further kinetic analysis revealed that saturating amounts of both forms of factor Va yielded the same  $k_{cat}$  for prothrombin activation. The  $K_m$  of prothrombin determined at a saturating concentration of factor  $Va_{(NO)}$  is approximately 3 times higher than in the case of saturation with factor Va (0.87  $\mu$ M *versus* 0.24  $\mu$ M). These data indicate that factor  $Va_{(NO)}$  is impaired in its ability to interact with factor Xa and, to a lesser extent with prothrombin. In combination with the kinetic data this indicates that the small carboxyterminal peptide is required for optimal interaction of factor Va with prothrombin and factor Xa.

It has been known for a long time that gel electrophoresis of purified human factor Va shows a heavy chain of 105 kD and two slightly different light chains of 74 and 71 kD, respectively. Because factor Va consists of an equimolar complex of a heavy chain and a light chain, two different molecular forms of factor Va must exist. This posed the following questions 1). are these two forms of factor Va functionally identical, and 2). do they originate from two forms of circulating factor V in plasma or are they generated during activation by thrombin. In Chapter 6, we addressed these questions and we describe the separation and kinetic analysis of these two



forms of factor Va. We separated purified factor Va on a MonoS column, factor Va bound to the column and eluted in two separate peaks in a linear  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gradient. Factor Va with a 74kD light chain eluted at 450 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (factor  $\text{Va}_1$ ), whereas factor Va with the 71kD light chain eluted at 750 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (factor  $\text{Va}_2$ ) indicating that the two forms differ considerably in charge. Approximately  $1/3$  of the factor Va eluted as factor  $\text{Va}_1$  and  $2/3$  as factor  $\text{Va}_2$ . When tested under reaction conditions suboptimal with respect to factor Xa and phospholipid concentrations the two factor Va forms express different cofactor activity in the prothrombinase complex. Using rates of prothrombin activation as a measure for the amount of factor Xa-Va complexes formed, an apparent  $K_d$  ( $K_{1/2\text{Va}}$ ) for Xa-Va complex formation of 5.9 nM for factor  $\text{Va}_1$  and 0.45 nM for factor  $\text{Va}_2$  was obtained. These results were obtained with phospholipids containing a low percentage anionic phospholipid (DOPS/DOPC; 5/95; M/M; 2  $\mu\text{M}$ ). When the mole percentage PS is increased (to 20 mole% PS) the difference in factor Xa-Va complex formation disappear ( $K_d$  app 0.047 nM factor  $\text{Va}_1$  versus 0.044 nM factor  $\text{Va}_2$ ). However, even with these phospholipids differences between factor  $\text{Va}_1$  and factor  $\text{Va}_2$  can be observed provided the concentration of phospholipid is sufficient low. Thus at a 20-fold lower phospholipid concentration (0.1  $\mu\text{M}$ ) the  $K_d$  app for factor Xa-Va complex formation at the phospholipid membrane surface is 0.4 versus 0.044 nM for factor  $\text{Va}_1$  and factor  $\text{Va}_2$  respectively. This indicates that the different efficiencies by which factors  $\text{Va}_1$  and  $\text{Va}_2$  incorporate in the prothrombinase complex are at higher phospholipid concentrations compensated by an increased number of binding sites on the phospholipid membrane. At saturating factor Va concentrations prothrombin activation rates were essentially the same in these experiments, indicating that the two forms express the same catalytic activity in prothrombin activation but differ in their ability to form a Xa-Va complex at the phospholipid surface. Direct binding experiments to a planar phospholipid bilayer in an ellipsometer indicated that factor  $\text{Va}_2$  bound with high affinity ( $K_d = 0.53$  nM) whereas binding affinity of factor  $\text{Va}_1$  was relatively low ( $K_d = 24$  nM). These results show that factor  $\text{Va}_1$  and  $\text{Va}_2$  are not identical, but differ in their ability to assemble into a Xa-Va complex on a phospholipid membrane and this difference is caused by different binding properties. Purified plasma factor V also binds to MonoS and elutes in two (overlapping) peaks. Upon activation of the factor V containing fractions with thrombin, factor V eluting at a low salt concentration in the gradient yielded the 74kD light chain whereas factor V eluting at a higher salt concentration yielded the 71kD light chain. It is concluded that the basis for the two factor Va forms is already present in the factor

V molecule. When platelets are activated with thrombin and passed over MonoS, factor Va activity elutes at 450 and 750 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectively, indicating that platelet factor V is also heterogeneous. The conclusion from the experiments described in Chapter 6 therefore is that factor V is present in plasma and blood platelets in two forms which differ in the carboxyterminal domain of factor V (the domain from which the light chain originates). Upon activation these two factor Va forms neither differ in their interaction with prothrombin nor in their capacity to promote the catalytic activity of factor Xa, but exhibit considerable differences in their ability to assemble into a membrane-bound factor Xa-Va complex caused by a different affinity for the procoagulant membrane. This heterogeneity in factor V molecules might be introduced during post-ribosomal processing of factor V. Recently, Ortel and coworkers (1992) showed that the structural basis for the light chain doublet is found in the C2 domain. Furthermore, this group has shown that within the C2 domain of factor Va a phosphatidylserine-specific binding site is located (Ortel *et al.*, 1992). It is conceivable that this PS binding site is more exposed in the factor Va<sub>2</sub> form accompanied with a relatively increased positive charge of the light chain. Further experiments are needed to resolve the question what the structural difference is between the two factor Va forms. Differences at the carboxyterminus of factor V might be shown using C-terminal amino acid sequencing techniques. Alternatively differences in the carbohydrate moieties on the light chain may also be the cause of factor V heterogeneity. Questions arise whether there is a difference in activation of the two factor V forms. Furthermore, it is interesting to see whether activated platelets support Xa-Va complex formation with both factor Va forms to the same extend.

The light chain of factor Va is reported to be involved in binding of activated protein C (APC). In factor Va and VIIIa light chain a binding site for protein C has been identified. This APC binding site is located in the A3 domain of factor Va and factor VIIIa (Krishnaswamy *et al.*, 1986; Fay and Walker, 1989; Walker *et al.*, 1990). It is possible that the two factor Va light chains have different binding affinities for APC. This consequently results in differences in inactivation rates for the two factor Va forms. Another phenomenon is the effect of factor Va light chain on the activation of protein C. Salem and coworkers (1984) showed that factor Va light chain accelerate protein C activation by thrombin. Again it is not clear whether both factor Va forms accelerate this reaction to the same extend. The effects of both factor Va forms in the protein C pathway as described above remains to be examined. It might be expected that at the early stages of coagulation small amounts



of membrane surfaces for factor Va binding are formed. In this case, factor Va<sub>2</sub> (high affinity fraction) will bind first to the membranes forming a receptor for factor Xa. When more procoagulant membranes are generated (activated platelets) also factor Va<sub>1</sub> will bind. It is possible that factor Va<sub>1</sub> preferentially plays a role in the protein C pathway. In this light, it is conceivable that in patients with mild bleeding or thrombotic tendencies the ratio of the two factor Va forms is altered. The function of the two different forms of factor V (and factor Va) remains to be established.



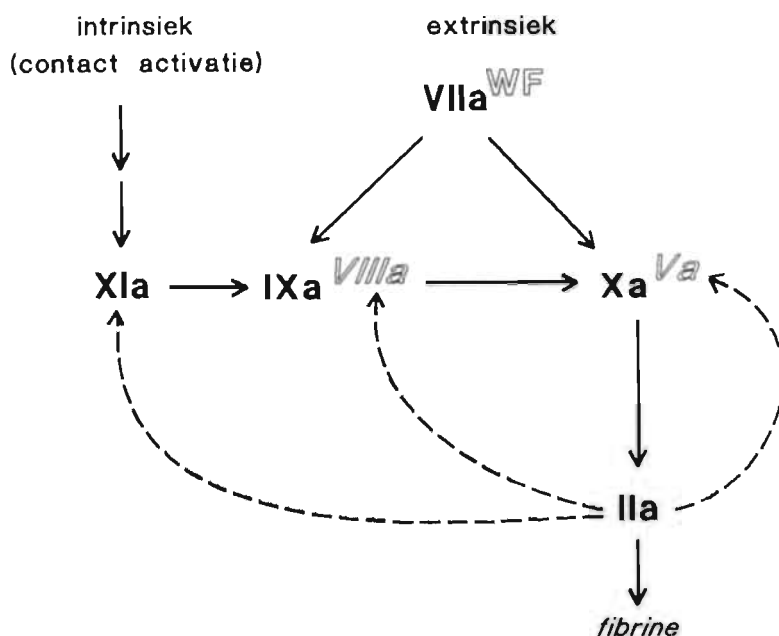


### **SAMENVATTING en SLOTOPMERKINGEN**

*Deze sectie is voornamelijk bedoeld voor diegenen die het Engels niet goed beheersen, en onbekend zijn met de biochemie van de bloedstolling. Daarom geef ik in deze Nederlandse samenvatting eerst een korte inleiding over wat bloedstolling is, daarna volgt een samenvatting van de hoofdstukken, afgesloten door suggesties voor nieuw onderzoek.*

Als een bloedvat beschadigd wordt treed er bloedverlies op. Bloedstolling is de omzetting door het enzym trombine van het oplosbare fibrinogeen naar het onoplosbare fibrine. Het basale beschermingsmechanisme ter voorkoming van bloedverlies omvat verscheidene cellulaire en (bloed)plasmacomponenten. Daarnaast zijn er fysiologische effecten op de betrokken bloedvaten. Het stoppen van bloedingen in kleine bloedvaten kan spontaan gebeuren door het samentrekken van het bloedvat. In grote bloedvaten is een bloedprop gevormd uit bloedplaatjes en fibrine het belangrijkste mechanisme van bloedstelping. Deze hemostatische bloedprop wordt in eerste instantie gevormd door aggregatie van bloedplaatjes waarna fibrinedraden worden gevormd. Het volledig gevormde solsel bevat bloedplaatjes, rode en witte bloedlichaampjes in een fibrine netwerk. Het biochemische proces dat leidt tot bloedstolling is feitelijk een serie opeenvolgende activeringen waarbij inactieve pro-enzymen geactiveerd worden tot proteolytische (eiwitsplitsende) enzymen. Een typisch aspect van deze cascade is de grote versterking als gevolg van opeenvolgende reacties. De totale versterking van dit proces kan in de orde van  $10^6$  (miljoen) maal zijn. De enzymen die betrokken zijn bij de bloedstolling circuleren in de bloedstroom als pro-enzymen in een inactieve vorm. Ze worden geactiveerd tot actieve eiwitsplitsende enzymen door splitsing van een of twee peptide bindingen. Deze pro-enzymen worden aangeduid met Romeinse cijfers. De geactiveerde stollingsfactor wordt aangeduid door toevoeging van een kleine 'a'.

Het enzym trombine (factor IIa) wordt gevormd uit het pro-enzym protrombine (factor II), deze activering kan verlopen via twee routes, de intrinsieke



**Figuur 1.** Een vereenvoudigd schema van de extrinsieke bloedstolling. Als bloed in contact komt met weeßelfactor (WF) bindt factor VII uit bloed hieraan, het pro-enzym factor VII wordt omgezet naar de actieve vorm, factor VIIa. Factor VIIa activeert de pro-enzymen factor IX en X. Factor IXa activeert ook factor X en is daarmee een belangrijke verbinding tussen de extrinsieke en intrinsieke stolling. Factor X activeert protrombine (factor II) naar trombine (factor IIa) die fibrinogeen in het onoplosbare fibrine omzet. Trombine activeert de cofactoren V en VIII en het pro-enzym factor XI. (figuur naar Hemker and Lindhout, 1984)

en extrinsieke stolling.

De extrinsieke stolling wordt gezien als belangrijk bij het starten van het stolproces (Davie *et al.*, 1991). Het extrinsieke stollingsproces wordt gestart wanneer bloed in contact komt met *weeßelfactor* (WF, Figuur 1). Weeßel direct achter de wand van een bloedvat hebben *weeßelfactor* gebonden op het celoppervlak. Bloed komt dus in contact met *weeßelfactor* als de binnenwand van

een bloedvat beschadigd raakt. *Weefselfactor* bindt dan het pro-enzym factor VII uit bloed, dan wordt factor VII actief (factor VIIa-WF complex) en kan vervolgens de proenzymen factor X en factor IX activeren (Figuur 1). Factor X wordt niet alleen door het VIIa-WF complex geactiveerd, maar ook door factor IXa. Deze reactie vormt een versterkingslus in de activering van factor X, waar extrinsieke en intrinsieke stolling bij elkaar komen. Factor Xa activeert dan protrombine (factor II) naar trombine (factor IIa). Trombine is het enzym dat uiteindelijk verantwoordelijk is voor de omzetting van het in oplossing zijnde fibrinogeen naar het onoplosbare fibrine, het uiteindelijke stolsel.

De intrinsieke stolling is vermoedelijk verantwoordelijk voor het gaande houden van de trombine vorming (Davie *et al.*, 1991). Trombine activeert het pro-enzym factor XI dat weer factor IX kan activeren. De intrinsieke stolling kan ook op gang gebracht worden door contact met lichaamsvreemde oppervlakken, bijvoorbeeld glas. Bij de stolling zijn ook zogenaamde cofactoren betrokken. De factoren V en VIII (zie figuur 1) zijn beide cofactoren en circuleren in het bloed in een inactieve vorm. Beide cofactoren worden geactiveerd door trombine. Deze

Tabel 1. Kinetische eigenschappen van de protrombinase (Xa-Va) en tienase ((IXa-VIIIa) complex bestanddelen. In beide gevallen is het duidelijk dat aanwezigheid van fosfolipide membranen de  $K_m$  verlaagt en dat de cofactoren de  $k_{cat}$  verhogen. (Gegevens afkomstig van Rosing *et al.*, 1980; van Dieijen *et al.*, 1981)

Bestanddeel Protrombinase	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ mol IIa·s <sup>-1</sup> ·mol Xa <sup>-1</sup>	Relatieve katalytische Efficiëntie
Xa	84	0.011	1
Xa, Va	34	6.22	1,400
Xa, membraan	0.06	0.038	4,800
Xa, Va, membraan	0.21	32.0	1,130,00

Bestanddeel Tienase	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ mol Xa·s <sup>-1</sup> ·mol IXa <sup>-1</sup>	Relatieve Katalytische Efficiëntie
IXa	181	$1.8 \cdot 10^{-4}$	1
IXa, membraan	0.058	$4.1 \cdot 10^{-5}$	730
IXa, VIIIa, membraan	0.063	8.3	140,000,000



geactiveerde cofactoren, factor VIIIa en Va, hebben zelf geen enzymatische activiteit maar versterken de enzymwerking van de enzymatische stollingsfactor, respectievelijk factor IXa en factor Xa, waarmee ze een complex vormen (Tabel 2). De geactiveerde cofactoren binden dan met één deel van het eiwit aan een geschikt membraanoppervlak en een ander deel van het eiwit bindt dan aan een geactiveerd pro-enzym.

Het effect van de cofactor op de reactie kan beschouwd worden als het resultaat van drie effecten:

- 1) Een verhoging van de omzettingssnelheid ( $k_{cat}$ ) van de reactie.
- 2) Het lokaliseren van het enzym-cofactor complex aan membraan oppervlakken.
- 3) Bevorderen van de substraatbinding aan het enzym-cofactor complex.

Door de laatste twee genoemde eigenschappen kan een cofactor beschouwd worden als een membraan receptor voor zowel enzym als substraat.

Een belangrijke eigenschap van de bloedstollingsreacties is, dat ze beperkt zijn tot membraanoppervlakken. Deze membranen moeten aan bepaalde eisen voldoen, willen ze geactiveerde bloedstollingsfactoren kunnen binden. Dit soort voor de bloedstolling geschikte oppervlakken worden geleverd door geactiveerde bloedplaatjes en door beschadigde oppervlakken van cellen in de wand van het bloedvat. De aanwezigheid van membranen veranderen de kinetische eigenschappen van de activering en inactivering van stollingsfactoren (zie tabel 1 en Hoofdstuk 3). De affiniteit voor het substraat wordt aanzienlijk verhoogd door de aanwezigheid van fosfolipide membranen ( $K_m$  gaat omhoog). De cofactoren factor Va en factor VIIIa hebben een relatief hoge bindingsaffiniteit voor fosfolipide membranen. Deze cofactoren kunnen worden beschouwd als 'receptor' voor de respectievelijke stollingsfactoren Xa en IXa op het membraanoppervlak. Een bijkomend voordeel van de lokalisatie op membraanoppervlakken is daardoor dat de reactiecomponenten in het stollingsproces elkaar gemakkelijker vinden.

Ongecontroleerde bloedstolling zou dodelijk zijn, daarom zijn er mechanismen aanwezig die de bloedstolling controleren en beperken tot de plaats van vaatwand beschadiging. Een van de controlesystemen is de aanwezigheid van enzymremmende stoffen in het bloed. Deze remmers zijn specifiek voor een bepaald enzym en leggen de activiteit van het enzym stil. Ze werken traag, waardoor er tijd zit tussen de start van de bloedstolling en de remming daarvan met als effect dat de stolling eerst goed op gang kan komen en daarna langzaam weer uitdooft.

Het andere systeem is de protein C route. De protein C route remt de bloedstolling sterk door selectieve inactivering van de cofactoren Va en VIIIa (Esmon, 1984). De protein C route omvat het pro-enzym protein C en de cofactor protein S. Het pro-enzym protein C moet net als de andere pro-enzymen eerst geactiveerd worden alvorens zijn functie uit te kunnen oefenen. Protein C wordt geactiveerd door trombine, zodat deze route pas geactiveerd wordt, als de bloedstolling goed op gang is gekomen en er voldoende trombine gevormd is. De cofactor protein S hoeft niet geactiveerd te worden.

*Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om meer inzicht te krijgen in enkele van de mechanismen via welke de trombine vorming wordt gecontroleerd tijdens de hemostase en in het bijzonder door de plasma eiwitten factor V (Va), geactiveerd proteïne C en protein S.*

Het eerste hoofdstuk geeft een overzicht van het mechanisme van de bloedstolling en een literatuur overzicht van de huidige inzichten met betrekking tot het werkingsmechanisme van deze eiwitten in de regulatie van protrombine-activering.

Zuivering van factor V uit menselijk (humaan) plasma is beschreven in hoofdstuk 2. Factor V circuleert in plasma in een concentratie van ongeveer 8 µg/ml (~ 25 nM). Vanwege de labiliteit van factor V is complete remming van proteases gedurende de isolatie procedure essentieel. De gehanteerde isolatie procedure voor factor V is ten dele gebaseerd op de procedure ontwikkeld door Dahlbäck (1980) en Suzuki *et al.* (1982). Wijzigingen die, wij hebben aangebracht in de procedure resulteerden in een verminderde isolatietijd, hogere opbrengst, hogere concentratie factor V en minder verontreiniging in het eind preparaat. Gel filtratie (methode om eiwitten op grootte te scheiden) wordt nu uitgevoerd met een Superdex-200 kolom gekoppeld aan een Pharmacia FPLC systeem. Een laatste ion-uitwisselings chromatografie (eiwitten worden op lading gescheiden) stap met een MonoS kolom op het FPLC systeem werd toegevoegd aan de procedure om de laatste onzuiverheden te verwijderen. Dit verbeterde onze factor V zuivering aanzienlijk in termen van snelheid, hoeveelheid en kwaliteit vergeleken met preparaten verkregen op lagedruk chromatografie materialen. Met behulp van deze procedure werd factor V meer dan 4000 maal gezuiverd uit plasma met een opbrengst van 20% in 55 uur.

Protein C is in geactiveerde vorm een belangrijke regulator van factor Va

(zie Hoofdstuk 4) en VIIIa activiteit. Activering van proteïne C door niet fysiologische activatoren is van belang omdat deze activatoren gebruikt kunnen worden als gereedschap bij het bestuderen van structuur-functierelaties van proteïne C, bij het maken van geactiveerd proteïne C (APC) uit proteïne C, en bij het ontwikkelen van functioneel proteïne C analyse bepalingen. Huidige kwantitatieve proteïne C bepalingen methoden gebruiken een proteïne C activator geïsoleerd uit het gif van de slang *Agkistrodon contortrix contortrix*. Deze reactie wordt sterk geremd door calcium ionen en (althans in het geval van menselijk proteïne C) door natriumchloride (NaCl ;keukenzout). Dit verschijnsel is in het bijzonder van belang voor het gebruik van deze activator in kwantitatieve proteïne C test systemen waardoor, door deze gevoeligheid, goed gedefinieerde reactie condities nodig zijn voor wat betreft ionsterkte en vrije calcium concentraties.

Hoofdstuk 3 beschrijft de zuivering en karakterisering van een proteïne C activator uit het slangegif van *Agkistrodon halys halys*. De proteïne C activator uit het *Agkistrodon halys halys* gif werd 533 voudig gezuiverd doormiddel van ionuitwisselingschromatografie op QAE-Sephadex A-50, affiniteitschromatografie op aprotinin-Sepharose (eiwitten worden gescheiden op grond van de specifieke bindingsaffiniteit voor het kolommateriaal, in dit geval aprotinine) en ionuitwisselingschromatografie op een MonoQ kolom in een FPLC systeem. Het gezuiverde enzym is een eiwit bestaande uit een enkele keten met een moleculair gewicht van 36.000 Dalton. Activering van proteïne C is het gevolg van een specifieke splitsing in de zware keten van het molecuul. In het geval van proteïne C activering door zijn fysiologische activator thrombine, is deze splitsing geïdentificeerd als de verwijdering van een klein fragment van 1.400 Dalton van de aminoterminalen zijde van de zware keten (Kisiel, 1979). De proteïne C activator gezuiverd uit *Agkistrodon halys halys* gif activeert proteïne C hoogst waarschijnlijk via hetzelfde mechanisme. De proteïne C activator vertoont een hoge amidolytische activiteit voor de chromogene substraten S2302 en S2238. De activiteit van de activator wordt niet beïnvloed door thiolprotease of metalloprotease remmers. Aanzienlijke remming is daarentegen gemeten wanneer de proteïne C activator werd geïncubeerd met de (serine) protease remmer benzamidine en soybean trypsin inhibitor (een trypsine remmer geïsoleerd uit de soja boon), en vrijwel complete remming met de actieve centrum titrant pNPGb en de remmer PPACK. Dit is een indicatie dat de proteïne C activator van *Agkistrodon halys halys* een serine en een histidine residu in het actieve centrum bevat hetgeen het enzym als een serine protease klassificeert. De gezuiverde protease kan zowel menselijk als runder

protein C activeren. Activering van menselijk protein C met een redelijke snelheid gebeurt alleen in een calcium vrij reactie medium bij een lage ionische sterkte (weinig 'zout' aanwezig). Calcium ionen remmen de activering van menselijk protein C met een schijnbare  $K_i$  van 0.8 mM. Natriumchloride (keukenzout) remt ook sterk de activering van menselijk protein C (met een  $K_i$  schijnbaar van 20 mM NaCl). Hiermee in tegenstelling wordt de activatie van runder protein C nauwelijks beïnvloed door variaties in calcium of zout (natriumchloride) concentraties in het reactie medium. De schijnbare  $K_i$ 's voor calcium ion and zout (natriumchloride) remming van runder protein C activering zijn respectievelijk  $>10$  mM and 220 mM. Kinetische analyse van menselijk protein C activering door de slangegif activator (in een calcium vrij medium en bij lage zout concentratie (ionsterkte)) onthulde een schijnbare  $K_m$  voor protein C van  $0.52 \mu\text{M}$  en een omzettingssnelheid ( $k_{\text{cat}}$ ) van ruim 10 moleculen protein C per minuut ( $0.17 \text{ s}^{-1}$ ). De gevonden catalytische efficiëntie ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) is  $3.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Bij hogere ionsterkte wordt de activerings snelheid van menselijk protein C lineair met de protein C concentratie hetgeen duidt op een sterke stijging van de  $K_m$  met stijgende ionsterkte. Runder protein C wordt geactiveerd met een  $K_m$  van  $0.056 \mu\text{M}$  en een omzettingssnelheid van 14 moleculen protein C per minuut ( $k_{\text{cat}}$  is  $0.24 \text{ s}^{-1}$ ). De catalytische efficiëntie van runder protein C activering ( $k_{\text{cat}}/K_m = 4.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) is 13 maal beter dan van menselijk protein C activering. De reden daarvoor is een lagere  $K_m$  van de gif activator voor runder protein C. Deze cijfers zijn een indicatie voor een grote conformatie en/of een structuurverschil tussen menselijk en runder protein C bij fysiologische zout sterkte. Het lijkt er bovendien op dat in tegenstelling tot runder protein C, de conformatie van menselijk protein C aanzienlijk verandert met veranderende ionsterkte. Protein C activering door trombine wordt ook geremd door calcium ionen, maar als thrombomoduline aanwezig is, heeft deze reactie juist calcium nodig.

Factor Va cofactor activiteit *in vivo* (in levende organismen) wordt afgebroken door geactiveerd protein C (APC) in samenwerking met protein S. In hoofdstuk 4 hebben we het effect van calcium, fosfolipiden (kunstmatige nabootsing van cel oppervlakken) en protein S op de kinetische parameters van APC-gecatalyseerde factor Va geanalyseerd. Hierbij gebruikmakend van gezuiverde menselijke eiwitten. In overeenstemming met eerdere publicaties vonden wij dat factor Va inactivering door APC niet afhankelijk is van de aanwezigheid van fosfolipiden en protein S. De reactie, in afwezigheid van fosfolipiden, vereist de aanwezigheid van calcium. Bij de optimale calcium

concentratie (2 mM) verloopt de reactie met een tweede orde reactie constante van  $6.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . De inactiveringsreactie in een fosfolipide vrij reactie medium heeft een hoge  $K_m$  voor factor Va ( $>78 \text{ nM}$ ). APC-gekatalyseerde factor Va inactivering wordt aanzienlijk versneld door negatief geladen membraan oppervlakken. De mate waarin de fosfolipiden de reactie stimuleren is afhankelijk van de fosfolipide concentratie en samenstelling. Optimale snelheden van factor Va inactivering worden verkregen in aanwezigheid van  $10 \mu\text{M}$  fosfolipide vesicles met een hoog percentage anionische (negatief geladen) fosfolipiden. Onder deze reactie condities werd de APC gekatalyseerde factor Va inactivering gekarakteriseerd door een schijnbare tweede orde constante van  $1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Dit is 230 maal hoger dan de reactiesnelheid in afwezigheid van fosfolipiden in het reactie medium. Het stimulerend effect van fosfolipiden op APC gekatalyseerde factor Va inactivering vertoont een duidelijk optimum voor fosfolipid concentratie en fosfolipid (DOPS/DOPC) compositie. Membranen die enkel zijn opgebouwd uit het neutrale fosfolipide fosfatidylcholine zijn niet in staat de APC gekatalyseerde factor Va inactivering te versnellen. Dus om factor Va inactivering te stimuleren moeten membranen negatief geladen (anionische) fosfolipiden bevatten. Het vermogen om factor Va inactivering te stimuleren is niet beperkt tot fosfatidylserine (een negatief geladen fosfolipide) bevattende membranen aangezien membranen met andere negatief geladen fosfolipiden ook de factor Va inactivering aanzienlijk stimuleren. Het vermogen van verschillende fosfolipiden om de factor Va inactivering te stimuleren neemt toe met de volgorde fosfatidylethanolamine < olie zuur < fosfatidyl zuur < fosfatidylglycerol < fosfatidylmethanol < fosfatidylserine. Versnelling van de APC gekatalyseerde factor Va inactivering door negatief geladen membranen is waarschijnlijk een gevolg van het feit dat APC en factor Va allebei binden aan dergelijke membranen. Dit maakt de inactivering van membraan gebonden factor Va door membraan gebonden APC mogelijk. De schijnbare  $K_m$  voor factor Va is aanzienlijk verlaagd in aanwezigheid van fosfolipide membranen in het reactiemedium. Als de concentratie fosfolipiden wordt verhoogd is er een parralelle verhoging van de  $K_m$ . Ook de maximale reactie snelheid ( $V_{\max}$ ) van APC gekatalyseerde inactivering van factor Va blijkt een functie te zijn van de fosfolipide concentratie. De  $V_{\max}$  neemt toe met de concentratie fosfolipide aanwezig in het reactie medium en bereikt een plateau bij  $10 \mu\text{M}$  fosfolipide.

Dit suggereert duidelijk, dat in aanwezigheid van fosfolipide (membraan)oppervlak gebonden factor Va geïnactiveerd wordt door oppervlak gebonden APC. Bovendien geven de experimenten beschreven in Hoofdstuk 4

duidelijk aan dat bevordering van proteïne S voor het binden van APC aan membranen van geringe betekenis is in het gezuiverde menselijke systeem.

In een model waarin proteïne S de binding van APC aan fosfatidylserine bevattende membranen bevordert zou men verwachten dat proteïne S het stimulerend effect bij voorkeur zou laten zien bij lage fosfolipide concentraties en op membranen met weinig fosfatidylserine, met andere woorden onder die condities waarbij de snelheid van factor Va inactivering wordt beperkt door de binding van APC aan het membraan. De afwezigheid van stimulatie onder beperkende condities mag beschouwd worden als een ondersteuning van de alternatieve hypothese dat proteïne S het vermogen van factor Xa om factor Va te beschermen tegen inactivering door APC opheft, of dat andere eiwitten (bijvoorbeeld een plasma proteïne S bindend eiwit) nodig zijn voor het tot volle expressie brengen van de antistollings activiteit van proteïne S (Walker, 1986). Bovendien is het mogelijk dat proteïne S andere antistollings eigenschappen bezit, zoals de recentelijk beschreven APC onafhankelijke interactie van proteïne S met factor Va (Heeb *et al.*, 1993). Het is duidelijk dat het werkings mechanisme van proteïne S als antistollings eiwit nog niet vastgesteld is.

Proteolytische enzymen uit slangegif blijken uitstekend gebruikt te kunnen worden als gereedschap bij het bestuderen van structuur en functie relaties in stollingsfactoren. Een proteolytisch enzym instaat tot het inactiveren van factor Va is eerder geïsoleerd uit het gif van de slang *Naja naja oxiana* (NO) (Gerads *et al.*, 1992). Het enzym uit *Naja naja oxiana* gif verandert factor Va in een molecuul met sterk verminderde cofactor activiteit (factor Va<sub>(NO)</sub>). Incuberen van factor Va met het gif protease resulteert in een tijds afhankelijk verlies van factor Va activiteit met een stabiele overblijvende activiteit van 10-15%.

In Hoofdstuk 5 beschrijven we de structurele veranderingen in factor Va als gevolg van incubatie met het *Naja naja oxiana* enzym. De ontstane verandering in cofactor activiteit van factor Va<sub>(NO)</sub> werd daarna geanalyseerd. SDS-PAGE heeft aan het licht gebracht dat de moleculaire massa van de zware keten veranderde van 105 kD naar ongeveer 100 kD na incubatie met het gif protease. De lichte keten verandert niet na incubatie van factor Va met de NO protease. Binding studies aan vlakke fosfolipide dubbellen in een ellipsometer lieten zien dat factor Va and factor Va<sub>(NO)</sub> met gelijkwaardige affiniteit binden aan het fosfolipide oppervlak ( $K_d$ 's van respectievelijk 4.2 en 2.8 nM ). Uit dit experiment concluderen we dat de verlaagde cofactor activiteit van factor Va<sub>(NO)</sub> in de protrombine activering niet veroorzaakt wordt door verlaagde bindingsaffiniteit van factor Va<sub>(NO)</sub> aan



fosfolipide membranen. N-terminale aminozuur sequentieanalyse onthulde dat de factor  $Va_{(NO)}$  preparaten naast de bekende termini van de zware en lichte keten van factor Va een nieuwe terminus was gevormd met de aminozuur volgorde Asp-Arg-Leu-Glu-Pro-Glu. Vergelijking van de nieuw gevormde N-terminus in factor  $Va_{(NO)}$  met de uit de literatuur bekende complete aminozuur volgorde van factor V laten zien dat het slangegif enzym de zware keten splitst tussen His<sup>682</sup>-Asp<sup>683</sup>. Hierdoor wordt een stuk van 27 aminozuren afgesplitst van de carboxyterminale zijde van de zware keten. De cofactor activiteiten van factor Va en factor  $Va_{(NO)}$  zijn met elkaar vergeleken door het meten van het vermogen om factor Xa gekatalyseerde protrombine activering te ondersteunen in aanwezigheid van membranen (fosfolipiden) en calcium. Factor Va and  $Va_{(NO)}$  allebei stimuleren de binding van factor Xa aan negatief geladen membraan oppervlakken. De hoeveelheden van factor Va en  $Va_{(NO)}$  die nodig zijn voor half maximale vorming van het protrombinase complex verschilt aanzienlijk (0.7 nM factor Va *versus* 9.42 nM factor  $Va_{(NO)}$ ). Verdere kinetische analyses tonen dat verzadigende hoeveelheden van beide vormen van factor Va in een zelfde  $k_{cat}$  voor protrombin activering resulteerde. De  $K_m$  voor protrombine bepaald bij verzadigende concentraties van factor  $Va_{(NO)}$  is ongeveer 3 maal hoger dan in het geval dat een verzadigende concentratie factor Va werd gebruikt (0.87  $\mu$ M *versus* 0.24  $\mu$ M). Deze gegevens geven aan dat factor  $Va_{(NO)}$  sterk verzwakt is in zijn mogelijkheid om met factor Xa een interactie aan te gaan en dit geldt in mindere mate voor de interactie met protrombine. In combinatie met de kinetische gegevens geeft dit aan dat het kleine carboxyterminale fragment van de zware keten van factor Va nodig is voor een optimale interactie van factor Va met protrombine en factor Xa.

Het is al lange tijd bekend dat gezuiverd factor Va op PA-gels (een methode om eiwitten op grootte te scheiden en door kleuring zichtbaar te maken; zie b.v. hoofdstuk 2, figuur 1) een zware keten van 105kD en twee enigszins verschillende lichte ketens van respectievelijk 74 en 71kD laat zien. Omdat factor Va bestaat uit een complex met een zware en een lichte keten, moeten er twee verschillende vormen van factor Va bestaan. Dit stelde ons voor de volgende vragen 1) Zijn deze twee vormen van factor Va functioneel identiek en 2) Zijn ze afkomstig van twee vormen in bloed circulerend factor V of worden ze gegenereerd tijdens activatie door trombine.

In Hoofdstuk 6 richten we ons op deze vragen en beschrijven we de scheiding en kinetische analyse van de twee factor Va vormen. We scheiden gezuiverd factor Va op een MonoS kolom, factor Va bond aan de kolom en liet los

in gescheiden pieken in een lineair zout (ammoniumchloride;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) gradient. Factor  $\text{Va}$  met een 74kD lichte keten liet los van de kolom bij 450 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (factor  $\text{Va}_1$ ) factor  $\text{Va}$  met de 71kD lichte keten spoelde daarentegen van de kolom bij 750 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (factor  $\text{Va}_2$ ). Dit geeft aan dat de twee factor  $\text{Va}$  vormen aanzienlijk in lading verschillen. Ongeveer  $1/3$  van de factor  $\text{Va}$  elueerde als factor  $\text{Va}_1$  en  $2/3$  als factor  $\text{Va}_2$ . De twee factor  $\text{Va}$  vormen vertonen verschillende cofactor activiteiten in het protrombinase complex als ze getest worden onder suboptimale omstandigheden voor wat betreft de factor  $\text{Xa}$  en fosfolipide concentraties. Gebruikmakend van de snelheid van protrombine activering als een maat voor de hoeveelheid factor  $\text{Xa-Va}$  complexen gevormd, werd een schijnbare  $K_d$  ( $K_{1/2\text{Va}}$ ) voor  $\text{Xa-Va}$  complex vorming van 5.9 nM voor factor  $\text{Va}_1$  en 0.45 nM voor factor  $\text{Va}_2$  gevonden. Deze resultaten werden verkregen met membranen waarin een laag percentage negatief geladen fosfolipide aanwezig was (DOPS/DOPC; 5/95; M/M; 2  $\mu\text{M}$ ). Wanneer het percentage van de negatief geladen fosfolipide werd verhoogd (tot 20 mole% PS) verdween het verschil in de factor  $\text{Xa-Va}$  complex vorming ( $K_d$  schijnbaar 0.047 nM factor  $\text{Va}_1$  versus 0.044 nM factor  $\text{Va}_2$ ). Maar zelfs bij deze membranen kan een verschil tussen factor  $\text{Va}_1$  en factor  $\text{Va}_2$  gevonden worden als de concentratie fosfolipiden maar laag genoeg wordt. Bij een 20 maal lagere fosfolipide concentratie (0.1  $\mu\text{M}$ ) is de  $K_d$  schijnbaar voor factor  $\text{Xa-Va}$  complex vorming is respectievelijk 0.4 versus 0.044 nM for factor  $\text{Va}_1$  and factor  $\text{Va}_2$ .

Dit betekent dat de verschillende efficiënties waarmee de factoren  $\text{Va}_1$  and  $\text{Va}_2$  in het protrombinase complex incorporeren bij hogere fosfolipideconcentraties, gecompenseerd worden door een verhoogd aantal bindingsplaatsen. Bij verzadigende factor  $\text{Va}$  concentraties zijn de snelheden van protrombine activering voor al deze experimenten gelijk. Dit wijst er op dat de twee factor  $\text{Va}$  vormen dezelfde catalytische activiteit hebben in protrombine activering maar verschillen in de mogelijkheid om  $\text{Xa-Va}$  complexen te vormen op een fosfolipide oppervlak. Directe bindingsexperimenten aan vlakke fosfolipide dubbellen in een ellipsometer lieten zien dat factor  $\text{Va}_2$  bond met hoge affiniteit ( $K_d = 0.53$  nM) terwijl de bindingsaffiniteit van factor  $\text{Va}_1$  vrij laag was ( $K_d = 24$  nM). Deze resultaten geven duidelijk aan dat factor  $\text{Va}_1$  and  $\text{Va}_2$  niet identiek zijn maar verschillen in de mogelijkheid om te assembleren in een  $\text{Xa-Va}$  complex op een fosfolipide membraan en dat dit verschil veroorzaakt wordt door een verschil in membraan bindings eigenschappen. Gezuiverd factor  $\text{V}$  bind ook aan MonopS en spoelt in een zout gradient van de kolom in twee (overlappende) pieken. Na

activering van de factor V bevattende fracties met trombine bleek de factor V die het eerste van de kolom spoelde factor Va met een 74 kD lichte keten opleverde terwijl de bij meer zout eluerende factor V resulteerde in een factor Va met een 71 kD licht chain. Hieruit werd geconcludeerd dat de basis voor de twee factor Va vormen reeds aanwezig is in het factor V molecuul. Als trombine geactiveerde bloedplaatjes op een MonoS kolom gebracht wordt blijkt dat factor Va activiteit van de kolom elueert bij respectievelijk 450 and 750 mM zout ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Dit geeft aan dat bloedplaatjes factor V ook heterogeen is.

De conclusie uit de experimenten beschreven in Hoofdstuk 6 is dat factor V aanwezig in plasma en bloedplaatjes in twee vormen voorkomt die verschillen in het carboxyterminale domein van factor V (Dat is het domein waaruit de lichte keten gevormd wordt). Na activering verschillen de twee factor Va vormen niet in de interactie met protrombine of in de capaciteit om de catalytische activiteit van factor Xa te bevorderen, maar ze verschillen wel aanzienlijk in de mogelijkheid om te assembleren in een membraan gebonden factor Xa-Va complex veroorzaakt door verschil in bindingsaffiniteit voor membranen. Deze heterogeniteit in het factor V molecuul zou geïntroduceerd kunnen zijn tijdens post-ribosomale behandeling van factor V.

Recentelijk heeft Ortel en zijn medewerkers laten zien dat de structurele basis van de twee lichte ketenvormen op het C2 domein ligt. Hij liet verder zien dat op dit C2 domein van factor Va een fosfatidylserine specifieke bindingsplaats is gelocaliseerd (Ortel *et al.*, 1992). Het is aannemelijk dat deze fosfatidylserine bindingsplaats beter beschikbaar is in factor Va<sub>2</sub>, gepaard gaande met een relatief verhoogde positieve lading van de lichte keten.

Nadere experimenten zijn nodig om de vraag op te lossen wat het structurele verschil is tussen de twee factor Va vormen. Verschillen aan de carboxyterminale zijde van factor V zouden zichtbaar gemaakt kunnen worden met de recent ontwikkelde C-terminale aminozuur volgorde bepalingstechnieken. Verschillen in de koolhydraat ketens aan de lichte keten kunnen ook de oorzaak zijn van de factor V heterogeniteit. Een interessante vraag is of er een verschil is in activering van de twee factor V vormen. Verder is het interessant om te zien of op geactiveerde bloedplaatjes factor Xa-Va complex vorming voor beide factor Va vormen verschillend is.

In de literatuur is gerapporteerd dat de lichte keten van factor Va betrokken is bij de binding van geactiveerd proteïne C (APC) aan factor Va. Zowel in factor Va en factor VIIIa lichte keten is een bindingsplaats geïdentificeerd. Deze APC

bindingsplaats ligt op het A3 domein van factor Va en VIIIa (Krishnaswamy *et al.*, 1986; Fay and Walker, 1989; Walker *et al.*, 1990). Het is mogelijk dat de twee factor Va vormen verschillende bindingsaffiniteit hebben voor APC. Dit heeft tot gevolg dat er verschillende inactiverings snelheden zijn voor de twee vormen van factor Va. Een ander fenomeen is het effect van de lichte keten van factor Va op de activering van proteïne C. Salem en medewerkers (1984) lieten zien dat de factor Va lichte keten de activering van proteïne C door trombine versneld. Ook hier is het (nog) niet duidelijk of beide factor Va vormen in gelijke mate deze reactie versnellen. De effecten van beide factor Va vormen in de proteïne C route, zoals hierboven beschreven, moeten nog onderzocht worden. Verondersteld mag worden dat in de vroege fase van de bloedstolling kleine hoeveelheden geschikte membraan oppervlakken voor factor Va binding worden gevormd. In dat geval zal factor Va<sub>2</sub> (de hoge affiniteit fractie) als eerste zal binden aan het membraan waar het een receptor vormt voor factor Xa. Als er meer geschikte membraan oppervlakken worden gegenereerd (geactiveerde bloedplaatjes) zal ook factor Va<sub>1</sub> binden. Het is mogelijk dat factor Va<sub>1</sub> een belangrijke rol speelt in de proteïne C route. In dit licht is het aannemelijk dat in patiënten met lichte bloedings of trombose neigingen de verhouding van de twee factor Va vormen mogelijk is veranderd. De functie van de twee verschillende factor V (en factor Va vormen) moet nog opgehelderd worden.